

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-270129

(43)Date of publication of application : 25.09.2003

(51)Int.Cl.

G01N 21/27
G01J 3/443
G01J 3/51
G01N 21/64
G02B 21/00

(21)Application number : 2002-073839

(71)Applicant : YOKOGAWA ELECTRIC CORP

(22)Date of filing : 18.03.2002

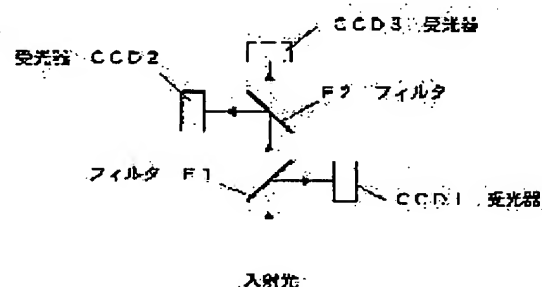
(72)Inventor : TANAAMI TAKEO

(54) INSTRUMENT FOR MEASURING IMAGE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To discriminatingly measure even lights in a plurality of fluorescence reagents, of which the wavelengths are close each other, and to reduce a loss in the light.

SOLUTION: In this image measuring instrument capable of discriminating components in the plurality of substances based on fluorescence, transmission light or reflected light having a plurality of wavelengths, an image is measured by a plurality of filters different respectively in characteristics for transmitting or reflecting spectra of the components in the plurality of substances at ratios different respectively, and a distribution of the components in the substances is measured based on a ratio of light quantities therein.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.09.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 30.01.2006

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-270129

(P2003-270129A)

(43) 公開日 平成15年9月25日 (2003.9.25)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テグト (参考)
G 0 1 N	21/27	G 0 1 N 21/27	A 2 G 0 2 0
			B 2 G 0 4 3
G 0 1 J	3/443	G 0 1 J 3/443	2 G 0 5 9
	3/51	3/51	2 H 0 5 2
G 0 1 N	21/64	G 0 1 N 21/64	E
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-73839 (P2002-73839)

(22) 出願日 平成14年3月18日 (2002.3.18)

(71) 出願人 000006507

横河電機株式会社

東京都武蔵野市中町2丁目9番32号

(72) 発明者 田名網 健雄

東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河
電機株式会社内

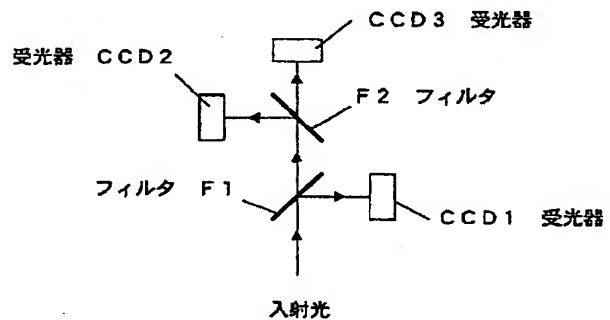
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 画像測定装置

(57) 【要約】

【課題】 波長の近い複数の蛍光試薬の光も区別して測定でき、光のロスも軽減された画像測定装置を提供する。

【解決手段】 複数の物質の成分を複数の波長の蛍光または透過光または反射光に基づいて区別することのできる画像測定装置において、前記複数の物質の成分のスペクトルをそれぞれ異なる比率で透過または反射する複数のそれぞれ特性の異なるフィルタにより画像を測定し、その光量の比率により前記物質の成分の分布が測定できるように構成する。



FP04-0318-00WO-HP

04.11.16

SEARCH REPORT

【特許請求の範囲】

【請求項1】複数の物質の成分を複数の波長の蛍光または透過光または反射光に基づいて区別することのできる画像測定装置において、

前記複数の物質の成分のスペクトルをそれぞれ異なる比率で透過または反射する複数のそれぞれ特性の異なるフィルタにより画像を測定し、その光量の比率により前記物質の成分の分布が測定できるように構成されたことを特徴とする画像測定装置。

【請求項2】前記複数のフィルタは、同一画素に同時に存在する前記複数の物質の成分の数よりも1個多い個数であることを特徴とする請求項1記載の画像測定装置。

【請求項3】前記フィルタはダイクロイックミラーまたはダイクロイックプリズムであることを特徴とする請求項1または2記載の画像測定装置。

【請求項4】前記複数のフィルタは、各フィルタの透過または反射の合計光量が実質上100%となるように形成されていることを特徴とする請求項1ないし3のいずれかに記載の画像測定装置。

【請求項5】前記複数のフィルタは、発光蛋白質の分離に対応して、波長に比例して光量が増加するフィルタ、波長に比例して光量が減少するフィルタ、波長に比例して山形に変化するフィルタであることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載の画像測定装置。

【請求項6】透過型または反射型の顕微鏡用、あるいは蛍光顕微鏡用または共焦点顕微鏡用またはカメラ用に適用可能に構成されたことを特徴とする請求項1ないし5のいずれかに記載の画像測定装置。

【請求項7】測定対象を点または線で検出することのできる分光器を備え、測定対象の分光特性も測定できるようにした請求項1ないし5のいずれかに記載の画像測定装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、複数の成分を複数の波長の蛍光または透過光により区別する画像測定装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より蛍光顕微鏡はよく知られている。蛍光顕微鏡は、図9の概念図に示すように、光源5からの光がビームスプリッタ（またはダイクロイックミラーなど）6で反射し対物レンズ3を介して試料4に照射される。試料4に付けられた蛍光試薬が照射光により発光し、その蛍光は対物レンズ3、ビームスプリッタ6を通して、顕微鏡に搭載されたカメラ1で測定できるように構成されている。これによって、細胞内の特定の蛋白質などの成分の分布を色の違いで測定することができる。

【0003】カメラ1は、カラーカメラか、または白黒カメラと色フィルタを組合わせたものが使用される。カ

ラーカメラとしては、例えば「顕微鏡の使い方ノート」株式会社羊土社 2000年6月15日発行 P100に記載のような3板式のカラーCCDビデオカメラがある。

【0004】このビデオカメラは、図10に示すように、入射光を3色分解プリズム11により赤（R）、緑（G）、青（B）に分解し、それぞれをR、G、Bの各光学フィルタ12、13、14が接続されたモノクロCCDの受光器15、16、17で個別に受光する。CCDでは光電変換が行われ、その出力信号はビデオ信号として利用される。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このようなカラーCCDビデオカメラを用いた場合は次のような課題があった。R、G、B光学フィルタは図11

（a）のような透過特性を有する。試料からの蛍光が同図（b）に示すように1色の場合には、R、G、B光学フィルタで測定可能であるが、同図（c）に示すように波長の近い2つの蛍光がある場合（試料に2種類の色素が付けてあり、色素1と色素2の蛍光が発生する場合）は、2つが共にGフィルタを通して受光されるため2者の区別ができないという課題があった。また、フィルタでの光のロスも大きいという課題もあった。

【0006】本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、波長の近い複数の蛍光試薬の光も区別して測定でき、光のロスも軽減された画像測定装置を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】このような目的を達成するために、請求項1の発明では、複数の物質の成分を複数の波長の蛍光または透過光または反射光に基づいて区別することのできる画像測定装置において、前記複数の物質の成分のスペクトルをそれぞれ異なる比率で透過または反射する複数のそれぞれ特性の異なるフィルタにより画像を測定し、その光量の比率により前記物質の成分の分布が測定できるように構成されたことを特徴とする。

【0008】このような構成としたため、次のような効果が発揮される。分光器を用いることなく微妙なスペクトルの違いも区別して検出することができる。また、光利用効率の高いフィルタ特性を用いることができるため、人間の視感度に合わせる必要がなく、効率がよい。また、分光器を用いていないため演算処理を必要とせず、高速に物質の成分分布を推定することができる。また、通常のカメラで測定でき、安価に構成できる。また、波長特性の分解能においてカラーカメラよりも優れている。

【0009】この場合、請求項2のように、前記複数のフィルタは同一画素に同時に存在する前記複数の物質の成分の数よりも1個多い個数である。また、フィルタと

しては、請求項3のようにダイクロイックミラーまたはダイクロイックプリズムを用いることができる。さらに、フィルタは、請求項4のように各フィルタの透過または反射の合計光量が実質上100%となるように形成されている。

【0010】また、請求項5のように前記複数のフィルタは、発光蛋白質の分離に対応して、例えば、波長に比例して光量が増加するフィルタ、波長に比例して光量が減少するフィルタ、波長に比例して山形に変化するフィルタとする。

【0011】このような本発明は、請求項6のように、透過型または反射型の顕微鏡用、あるいは蛍光顕微鏡用または共焦点顕微鏡用またはカメラ用に、適用可能である。さらに、本発明は、請求項7のように、測定対象を点または線で検出することのできる分光器を備え、測定対象の分光特性も測定できるようにすることができる。

【0012】

【発明の実施の形態】以下図面を用いて本発明を詳しく説明する。図1は本発明に係る画像測定装置のフィルタ部分の一実施例を示す構成図である。なお、本実施例では光学顕微鏡と組み合わせて蛍光像を測定する画像測定装置を例にとって説明する。

【0013】図1において、F1は第1のフィルタ、F2は第2のフィルタ、CCD1、CCD2、CCD3はそれぞれCCDでなる受光器である。顕微鏡の試料からの反射光は、第1のフィルタF1で反射または透過する。反射した波長の光は受光器CCD1に入射する。CCD1は光電変換し、入力光の光量に対応した電気信号を出力する。

【0014】第1のフィルタF1を透過した光は、第2のフィルタF2で反射または透過する。反射した波長の光は受光器CCD2に入射され、光電変換される。第2のフィルタF2を透過した光は受光器CCD3に入射し、光電変換される。

【0015】本発明は、この各フィルタでの反射あるいは透過の比率を異ならせている。図2は反射あるいは透過の比を示す図である。なお、図には発光クラゲ由来の発光蛋白質ECFP（藍：ピーク波長475nm）、EGFP（緑：ピーク波長509nm）、EYFP（黄：ピーク波長527nm）の発光スペクトルも併せて示してある。

【0016】第1のフィルタF1で反射して受光器CCD1に入射する光の光量比は、図2の領域Aで示されるように、短波長域から波長の増加に対応して減少するようになっている。第2のフィルタF2で反射して受光器CCD2に入射する光の光量比は、図2の領域Bで示されるように、短波長域から波長の増加に対応して三角波状に変化するようになっている。

【0017】また、第2のフィルタF2を透過して受光器CCD3に入射する光の光量比は、図2の領域Cで示

されるように、短波長域から波長の増加に対応して増加するようになっている。なお、これら3つの光量比の合計は、各波長において実質上100%となっている。

【0018】図3は各受光器の光量を軸とした3次元座標において発光蛋白質ECFPとEGFPの位置をプロットしたもので、発光蛋白質ECFPとEGFPは図3に示すように座標の違いとして区別できる。

【0019】このように、ECFPとEGFPとのピーク値波長の違いは座標の違いとして現われ、したがって各受光器CCDの出力の比からECFPかEGFPのどちらであるかが識別できる。なお、実際には、ECFP、EGFP共に山形の分布をもつスペクトルであり、図3の座標表示では点ではなく領域となる。なお、他の発光蛋白質EYFPについても波長と出力の関係については上記と同様である。

【0020】このようにして各受光器により試料面の画像を測定し、その比率により試料の成分の分布を推定することができる。

【0021】なお、本発明は、上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。例えば、透過または反射の比は図4に示すように任意に形成することができる。いずれの場合も3つのフィルタの透過または反射の比率の合計は100%である。特に、同図(b)に示すように、使用する色素1、色素2に合わせて特性を決めることにより、高感度に検出でき、色素1と2とで受光器の出力の差は顕著となる。この方式は、人の肉眼が色を識別する方法を拡張し精密化したことに相当する。

【0022】また、フィルタF1、F2はダイクロイックミラーあるいは図5に示すような構成のダイクロイックプリズムDPでも構わない。また、本発明は、蛍光だけでなく、色が異なれば透過像あるいは反射像の分離も可能であり、透過型あるいは反射型の顕微鏡または蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡などに適用することができる。また、カメラ用にも適用可能であり、天体観測などにも利用できる。

【0023】実施例では2色の対象を区別しているが、この方式はn個の未知数を連立方程式で解くことに対応しているため、一般に同時にn色の対象がある場合には、n+1個のフィルタ出力、換言すればn+1個の受光器出力、の比から区別する。

【0024】図6に示すように対象が一色のときは、2種のフィルタがあればどの波長であってもa1とb1の比で測定可能である。また、図7に示すように同時2色のときは、a、b、cの特性が異なれば、aとbから λ_1 、bとcから λ_2 を測定することができる。

【0025】更に、図8に示すように点または線を検出できる分光器20を併用し、測定対象の一部をサンプリングして測定すれば、例えばEGFPがpHによって色（すなわちスペクトル）が変化するような場合でも、E

GFPの波長特性を割り出し、本発明の画像測定装置の演算式の校正やチェックに役立たせることもできる。

【0026】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば次のような効果がある。

(1) 微妙なスペクトルの違いも、分光器によらないで、容易に区別することができる。

(2) 測定対象に合わせた光利用効率の高いフィルタ特性を持つダイクロイックミラーを用いることができるため、RGBフィルタのように人間の目の特性に合わせる必要はなく、効率が良い。

【0027】(3) 分光器を用いて測定する場合はフーリエ変換などの処理が必要であるため測定に時間がかかるが、本発明ではそのような処理が不要であり、高速に測定できる。

(4) 高価な分光器を使用することなく通常のカメラの使用で足り、安価な画像計測装置が容易に実現できる。

(5) 従来例に挙げたような通常のカラークメラより波長特性の分解能が高い。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る画像測定装置の要部構成図である。

【図2】複数のフィルタによる透過または反射の比を説明するための図である。

【図3】異なる発光蛋白質のピーク波長の3次元座標上の表示図である。

【図4】フィルタの透過または反射の比の他の例を示す図である。

【図5】フィルタの他の実施例を示す模式図である。

【図6】対象の色の数とフィルタの個数についての関係を説明するための図である。

【図7】対象の色の数とフィルタの個数についての関係を説明するための他の図である。

【図8】分光器を併用した場合の概念的構成図である。

【図9】従来の蛍光顕微鏡の一例を示す概念的構成図である。

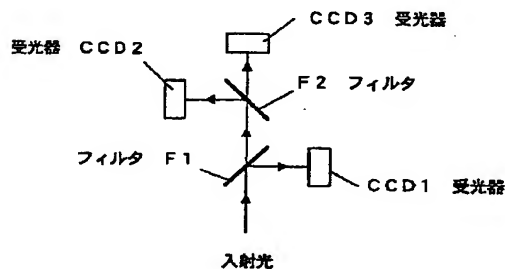
【図10】従来のカラービデオカメラの一例を示す構成図である。

【図11】従来のカラーテレビカメラのフィルタ特性についての説明図である。

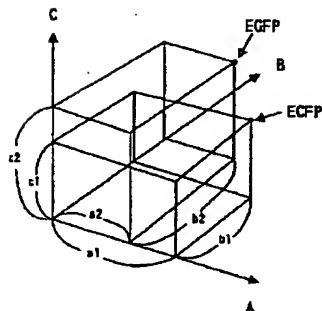
【符号の説明】

- 1 カメラ
- 2 顕微鏡
- 3 対物レンズ
- 4 試料
- 5 光源
- 11 3色分解プリズム
- 12, 13, 14 光学フィルタ
- 15, 16, 17 受光器
- F1, F2 フィルタ
- CCD1, CCD2, CCD3 受光器
- DP ダイクロイックプリズム

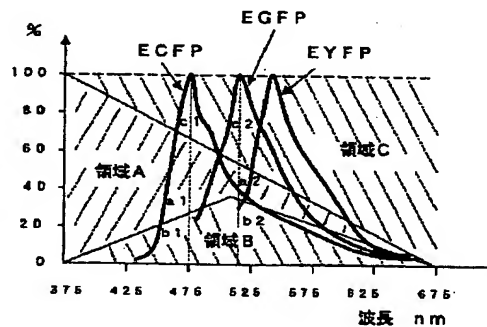
【図1】



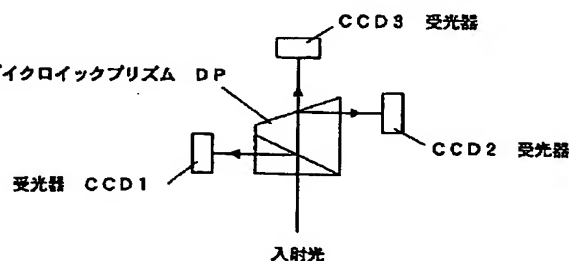
【図3】



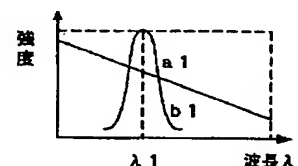
【図2】



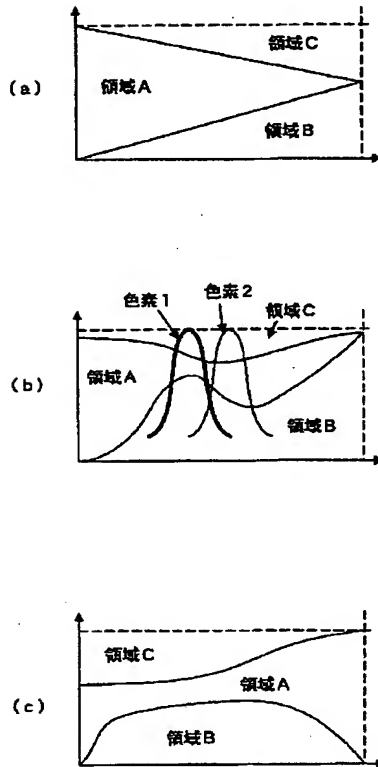
【図5】



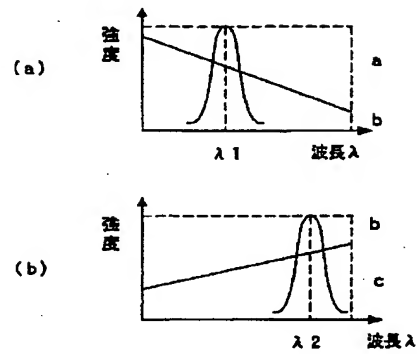
【図6】



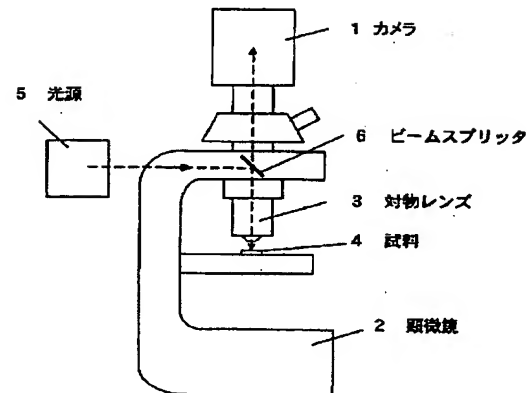
【図4】



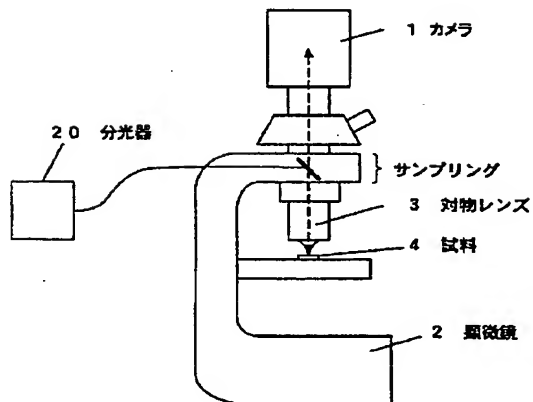
【図7】



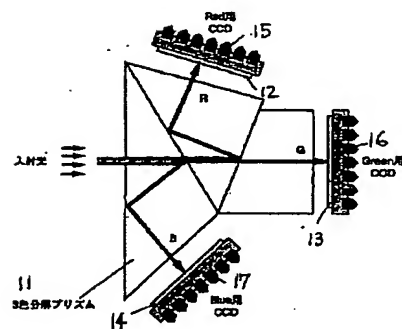
【図9】



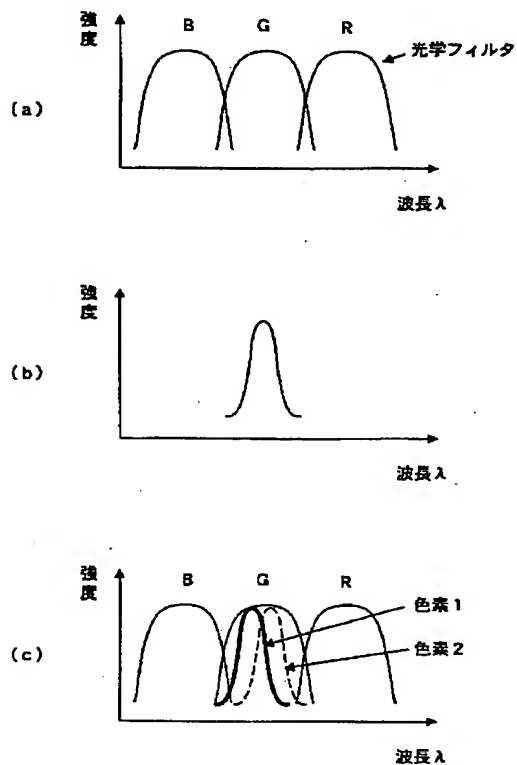
【図8】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

タームコード (参考)

G 0 1 N 21/64

G 0 1 N 21/64

F

G 0 2 B 21/00

G 0 2 B 21/00

F ターム (参考) 2G020 AA04 BA19 BA20 CA03 CB04

CB43 CC01 CC26 CC28 CC47

CD03 CD12 CD13 CD14 CD24

2G043 AA03 BA16 DA02 DA06 EA01

EA13 EA14 FA02 FA06 HA01

HA09 JA02 KA02 LA03

2G059 AA05 BB12 CC16 DD03 DD13

EE01 EE02 EE12 FF03 FF12

HH02 JJ02 JJ07 JJ11 JJ22

KK04 MM09

2H052 AA08 AA09 AF07